

· 研究简报 ·

## 利用Aldol反应合成新型同位素内标 $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基丁酸钙-D6

郭 会\*, 陈武炼

(上海安谱实验科技股份有限公司, 上海 201600)

**摘要:**  $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基丁酸钙作为食品添加剂已得到广泛应用,为了准确检测该添加剂在各种复杂食品基质中的含量,开发同位素稀释质谱法具有重要意义,而同位素内标是该方法所必需的基准物质。基于此背景,本文研究了一种新型同位素内标 $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基丁酸钙-D6及其合成方法。以丙酮-D6作为同位素来源,与乙酸乙酯经过Aldol反应形成 $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基丁酸乙酯-D6(1),再经过酯水解反应形成 $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基丁酸-D6(2),最后和氧化钙成盐制成 $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基丁酸钙-D6(3)。以消耗的乙酸乙酯计算化合物3的总产率可达80%。化合物3产品结构、纯度和氘同位素丰度经核磁共振波谱(NMR)、高效液相色谱(HPLC)和质谱(MS)表征确定, $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基丁酸钙-D6的化学纯度为98.68%,氘同位素丰度为99.86% D(原子分数),均高于98%,可为检测行业提供同位素内标,用于开发新的同位素稀释质谱法检测食品中 $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基丁酸钙的含量,还可制定新的 $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基丁酸钙的检测标准。

**关键词:**  $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基丁酸钙; 稳定同位素标记; Aldol反应; 合成; 表征

中图分类号: O628.1+1

文献标志码: A

DOI: 10.15952/j.cnki.cjsc.1005-1511.24180

## Synthesis of New Isotope Internal Standard Calcium $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate-D6 by Aldol Reaction

GUO Hui\*, CHEN Wulian

(Anpel Laboratory Technologies(Shanghai) Inc., Shanghai 201600, China)

**Abstract:** Calcium  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate has been widely used as a food additive. It is important to develop isotope dilution mass spectrometry in order to accurately detect the content of this additive in various complex food matrices. The isotope internal standard is the necessary reference material for the method. Based on this background, the synthesis method of a new isotope internal standard, calcium  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate-D6(1), was investigated. The acetone-D6 was the source of the isotope deuterium. First, acetone-D6 and ethyl acetate undergo an Aldol reaction to form  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate ethyl ester-D6. Then through ester hydrolysis reaction to form  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyric acid-D6(2). Finally, calcium  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate-D6(3) was prepared by  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyric acid-D6 and calcium oxide. The yields of deuterium-labeled calcium  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate-D6 was 80% based on acetone-D6 consumed. The structure, chemical purity and deuterium isotopic enrichment of the product were identified by NMR, HPLC and MS to be the target compound. The chemical purity of calcium  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate-D6 was 98.68%, and the deuterium isotopic enrichment was 99.86 % D(atom fraction). The chemical purity and deuterium isotopic enrichment were higher than 98%. It can provide an isotope internal standard for the detection industry to develop new isotope dilution mass spectrometry for the determination of calcium  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate content in food and establish a new detection standard for calcium  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate.

收稿日期: 2024-11-06; 修订日期: 2024-12-04。

第一作者: 郭会(1989-),男,汉族,安徽安庆人,硕士研究生,工程师,主要从事稳定同位素标记化合物研究, E-mail: guohui@anpel.com.cn。

**Keywords:** calcium  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate; stable isotope labeling; Aldol reaction; synthesis; characterization

1988年, STEVEN等<sup>[1]</sup>首次发现 $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基丁酸( $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyric acid, HMB)为一个含五碳的有机酸,是亮氨酸在体内通过其代谢产物 $\alpha$ -酮异己酸产生的一种衍生物。随后的研究发现, HMB具有减少肌肉损伤、促进蛋白质合成、维护细胞膜完整性和增强机体免疫等生物学功能<sup>[2-4]</sup>。由于HMB性质较为活泼,商业化产品通常以钙盐形式存在,即 $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基丁酸钙(Calcium  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate, CaHMB),以便于储存与使用<sup>[5]</sup>。

CaHMB广泛应用于保健品、医疗和健身等行业,如《GB 24154-2015 食品安全国家标准 运动营养食品通则》<sup>[6]</sup>和《GB 29922-2024 特殊医学用途配方食品通则(征求意见稿)》<sup>[7]</sup>均规定CaHMB可作为食品添加剂,并规定了每日食用量,但未公布CaHMB的检测方法,目前也并无相应的国家标准。已发表的CaHMB检测方法主要有气相色谱法<sup>[8]</sup>、气相色谱-串联质谱法<sup>[9]</sup>、高效液相色谱法<sup>[10-12]</sup>和高效液相色谱-串联质谱法<sup>[13-14]</sup>。随着可添加CaHMB的食品种类越来越多,现有检测方法在应对不同食品基质中CaHMB的含量检测时可能会出现较大缺陷。基于同位素稀释质谱法(Isotope dilution mass spectrometry, IDMS)能够显著降低基质效应,并且具有精确度高、灵敏度高和可靠性好等优点<sup>[15]</sup>,开发IDMS法检测食品中CaHMB的含量将具有重要意义。IDMS法需要同位素标记物作为内标,但目前市场上并没有CaHMB的同位素内标,因此,首先需要开发合适的同位素标记的CaHMB,为检测行业开发IDMS法检测食品中CaHMB的含量并制定标准提供同位素内标。

稳定同位素氘标记化合物的合成通常有两种策略:氘交换和以氘标记化合物作为起始原料进行合成。对于氘标记的CaHMB,核心是合成氘标记的HMB,而氘交换策略则较难实现。因此,本研究以氘标记化合物作为起始原料进行合成,该策略的核心是选择最合适且价廉易得的氘标记化合物作为起始原料,以最简单的合成路线实现氘标记目标化合物的合成。

张小卫<sup>[8]</sup>、黄雨晴等<sup>[16]</sup>分别报道了HMB的化学合成方法。目前最常见的主要有氧化法和Reformatsky反应。氧化法无论是采用过氧乙酸还是次氯酸钠,起始原料均为二丙酮醇,但是氘标记的二丙酮醇没有市售产品,因此氧化法难以实现氘标记HMB的合成。Reformatsky反应是通过溴乙酸乙酯先和锌粉形成有机金属卤化物,再和丙酮形成HMB-乙酯,然后水解得到HMB,该方法可以将丙酮或溴乙酸乙酯替换成氘标记的丙酮或溴乙酸乙酯,即可合成得到氘标记的HMB,但是需要用到易制爆的锌粉,危险性较大。习宁等<sup>[17]</sup>报道了一种利用Aldol反应合成HMB的方法。以丙酮和乙酸乙酯为原料,先通过Aldol反应形成HMB-乙酯,然后水解得到HMB。同理,换成氘标记的丙酮或乙酸乙酯,即可合成得到氘标记的HMB。该方法简单,不需要使用易制爆试剂,危险性小,是合成氘标记HMB的最合适方案。

在确定合成方案后,需考虑选用氘标记丙酮还是氘标记乙酸乙酯。从原子经济性角度考虑,优先选择氘标记丙酮。因此,最终确定以丙酮-D6作为起始原料引入稳定同位素氘,首先和乙酸乙酯发生Aldol反应得到 $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基丁酸乙酯-D6(1),然后酯水解得到 $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基丁酸-D6(HMB-D6, 2),最后和氧化钙成盐制成 $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基丁酸钙-D6(3),合成路线如图1所示。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

400 MHz型核磁共振仪(德国Bruker公司, D<sub>2</sub>O为溶剂, DSS为内标); Vanquish型液相-TSQ Quantis三重四极杆质谱联用仪(美国Thermo Fisher公司); LC-20A型高效液相色谱仪(日本岛津公司,液相色谱所用色谱柱为Athena C18-WP型液相色谱柱: 250.0 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m); TRACE 1300型气相色谱仪(美国Thermo Fisher公司,气相色谱所用色谱柱为CD-5气相毛细管色谱柱: 30.00 m×0.25 mm×0.25  $\mu$ m,固定相为聚(5%二苯基/95%二甲基,质量分数)硅氧烷; Z-5000型原子吸收分光光度计(日立公司); FD-1D-50+型真空冷

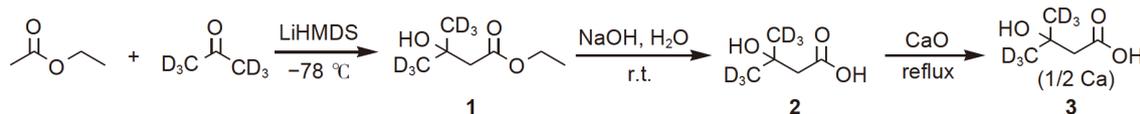


图1 化合物3的合成路线

Figure 1 The synthetic route of compound 3

冻干燥机(博医康(北京)仪器有限公司)。

丙酮-D6、重水:99.90% D(原子分数,下同), (美国CIL公司); CaHMB标准品(上海安谱实验科技股份有限公司);钙离子标准溶液(1000 mg/L, 国家标准物质中心)。其余所用试剂均为分析纯。

## 1.2 合成

### (1) 化合物1的合成

氮气保护下,将50 mL三口圆底烧瓶置于 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下,用注射器加入双三甲基硅基胺基锂(LiHMDS), $1.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  THF溶液(10.0 mL, 10.0 mmol),用注射器逐滴滴加乙酸乙酯(1.0 mL, 10.0 mmol),滴加完成后在 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下搅拌1 h,用注射器逐滴滴加丙酮-D6(1.0 mL, 12.0 mmol),滴加完成后在 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下搅拌反应1 h,反应结束后,在 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下滴加稀盐酸溶液(10.0 mL,  $2.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),恢复至室温,乙酸乙酯( $3\times 50\text{ mL}$ )萃取,合并有机相后用饱和碳酸氢钠溶液洗涤1次,有机相用无水硫酸钠干燥,通过硅藻土过滤,滤液减压旋蒸去除溶剂得到1.45 g化合物1:淡黄色油状液体,产率95%,无需纯化直接用于下一步反应。

### (2) 化合物2的合成

在100 mL单口圆底烧瓶中加入化合物1(1.45 g, 9.5 mmol),水(20 mL),氢氧化钠(800 mg, 20.0 mmol),室温搅拌反应过夜,反应结束后,滴加稀盐酸溶液( $2.0\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )调节反应液的pH值为4左右,乙酸乙酯( $3\times 50\text{ mL}$ )萃取,合并有机相,有机相用无水硫酸钠干燥,通过硅藻土过滤,滤液减压旋蒸去除溶剂得到1.11 g化合物2:淡黄色油状液体,产率94%,无需纯化立刻用于下一步反应。

### (3) 化合物3的合成

在100 mL单口圆底烧瓶中加入化合物2(1.11 g, 9.0 mmol),乙醇(40 mL),氧化钙(252 mg, 4.5 mmol),加热至回流搅拌反应2 h(开始时溶液呈混浊状态,加热后溶液逐渐变澄清),再加入200 mg活性炭,继续回流搅拌1 h,趁热通过硅藻

土过滤除去活性炭,滤液减压旋蒸去除溶剂,用真空冷冻干燥机冻干得到1.12 g化合物3:白色固体,产率90%;化学纯度:98.68%;氘同位素丰度:99.86% D;  $^1\text{H NMR}(\text{D}_2\text{O}, 400\text{ MHz})\ \delta$ : 2.33(s, 2 H,  $-\text{CH}_2-$ );  $^{13}\text{C NMR}(\text{D}_2\text{O}, 100\text{ MHz})\ \delta$ : 180.74( $-\text{CO}-$ ), 69.70( $-\text{COH}$ ), 49.21( $-\text{CH}_2-$ ), 26.52~27.55(*hept*,  $-\text{CD}_3$ ); MS(ESI) *m/z*: calcd for  $\text{C}_5\text{H}_3\text{D}_6\text{O}_3\{[\text{M}-1/2\text{Ca}-\text{H}]^-\}$  123.09, found 123.12。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Aldol反应条件分析

第一步丙酮-D6和乙酸乙酯发生Aldol反应得到化合物1是最关键的反应,Aldol反应的催化剂种类繁多,本工作参考文献<sup>[17]</sup>选择双三甲基硅基胺基锂(LiHMDS)作为催化剂,在此基础上优化了反应温度、反应时间和丙酮-D6的投料量,从而以最优产率获得化合物1。

根据Aldol反应机理,应先将乙酸乙酯和LiHMDS进行一定时间( $t_1$ )的反应形成烯醇负离子,再和丙酮-D6进行一定时间( $t_2$ )的反应才能获得化合物1。因此,固定乙酸乙酯(1.0 eq.)和LiHMDS(1.0 eq.)用量,考察反应温度( $T$ )、反应时间( $t_1$ 和 $t_2$ )和丙酮-D6的投料量对化合物1产率的影响(产率通过气相色谱面积归一化法检测确定),结果列于表1。结果表明,随着温度的升高(Entries 1~4),产率逐渐下降,其原因可能是烯醇负离子随着温度的升高稳定性下降,同时温度升高会使生成的化合物1失去一分子水形成副产物 $\alpha,\beta$ -不饱和羰基化合物<sup>[18]</sup>;乙酸乙酯和LiHMDS的反应时间须达到1 h以上,这可能是提前加入的丙酮-D6会和LiHMDS反应形成烯醇负离子,使副产物变多,在乙酸乙酯和LiHMDS充分反应1 h后加入丙酮-D6继续反应,随着反应时间的延长,化合物1的产率逐渐升高,当进行到1 h后,反应基本结束,产率达到最大,继续延长时间,对产率的影响不大(Entries 5~9);增加丙酮-D6投料量,化

表1 Aldol反应条件优化

Table 1 Optimization of Aldol reaction conditions

Entry	丙酮-D6/eq.	$t_1$ /h	$t_2$ /h	$T/^\circ\text{C}$	产率/%
1	1.0	1	1	-78	90.6
2	1.0	1	1	-40	85.2
3	1.0	1	1	0	62.4
4	1.0	1	1	25	50.8
5	1.0	0.5	0.5	-78	42.4
6	1.0	0.5	1	-78	46.5
7	1.0	1	0.5	-78	76.9
8	1.0	1	1	-78	90.6
9	1.0	1	1.5	-78	90.7
10	1.0	1	1	-78	90.6
11	1.1	1	1	-78	92.7
12	1.2	1	1	-78	95.1
13	1.3	1	1	-78	95.0
14	1.4	1	1	-78	95.1

合物1的产率会提高,当投料量为1.2 eq.时,产率达到最大,继续增加投料量,对产率基本没有影响(Entries 10~14)。综合以上结果,优选条件为乙酸乙酯(1.0 eq.)和LiHMDS(1.0 eq.)在 $-78^\circ\text{C}$ 下反应1 h,再加入丙酮-D6(1.2 eq.)继续在 $-78^\circ\text{C}$ 下反应1 h,以95.1%的最优产率得到化合物1。

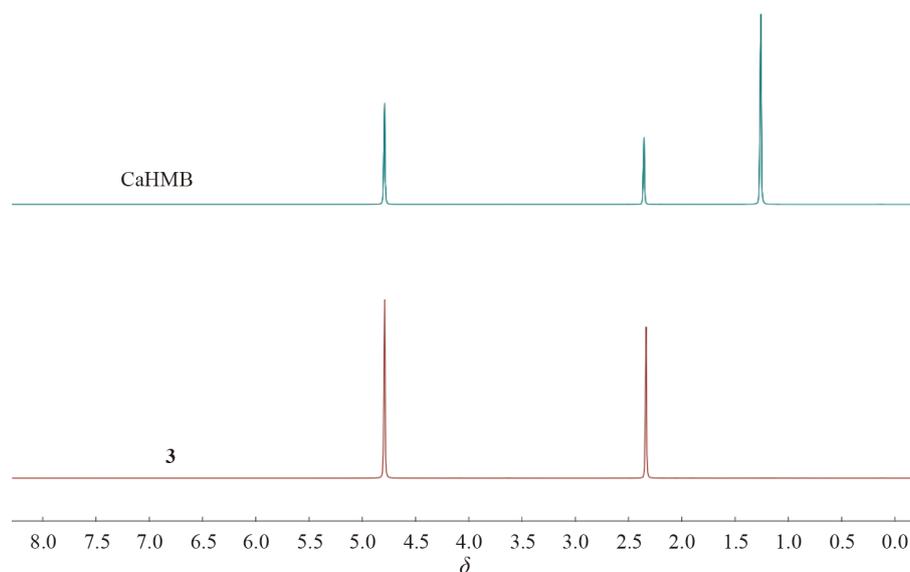
## 2.2 化合物3的结构表征

对合成得到的化合物3分别进行了核磁氢谱、核磁碳谱、质谱和钙离子含量表征,并和市售

CaHMB标准品进行对比,以此确证结构。CaHMB和化合物3的 $^1\text{H}$  NMR和 $^{13}\text{C}$  NMR对比谱图分别如图2~3所示。从图2  $^1\text{H}$  NMR对比谱图可以看出,化学位移1.26(s, 6H)处的甲基吸收峰消失,表明结构中两个甲基上共6个氢全部被氘取代;从图3  $^{13}\text{C}$  NMR对比谱图可以看出,化学位移28处为甲基上碳的吸收峰,当甲基氢全部被氘取代后,根据 $2n+1$ 规则,甲基上碳的吸收峰会裂分为七重峰,同时由于失去了氢对碳的NOE效应,所以该七重峰信号较弱,如图3中局部放大图所示,在 $\delta$  26.52~27.55处观察到信号较弱的七重峰。根据核磁氢谱和碳谱数据,证明化合物3的结构为CaHMB-D6。经LC-MS/MS检测, CaHMB和化合物3的MS(ESI)对比谱图如图4所示。在负离子模式下, CaHMB的分子离子峰为 $[\text{M}-1/2\text{Ca}-\text{H}]^- = 117.09$ ,化合物3的分子离子峰为 $[\text{M}-1/2\text{Ca}-\text{H}]^- = 123.12$ ,两者相差6,进一步证明化合物3的结构为CaHMB-D6,以消耗的同位素原料丙酮-D6计算, CaHMB-D6的收率达到80%。参考文献<sup>[19]</sup>报道的原子吸收光谱法测定化合物3中的钙百分含量为13.78%,和理论值13.99%相符。

## 2.3 化合物3的HPLC纯度分析

测试条件:色谱柱为Athena C18-WP(250.0 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),流动相为0.05 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾和乙腈的混合溶液(磷酸二氢钾:乙腈=95:5,  $V:V$ ),用磷酸溶液调节pH值为3.0,样

图2 CaHMB和化合物3的 $^1\text{H}$  NMR谱图Figure 2  $^1\text{H}$  NMR spectra of CaHMB and compound 3

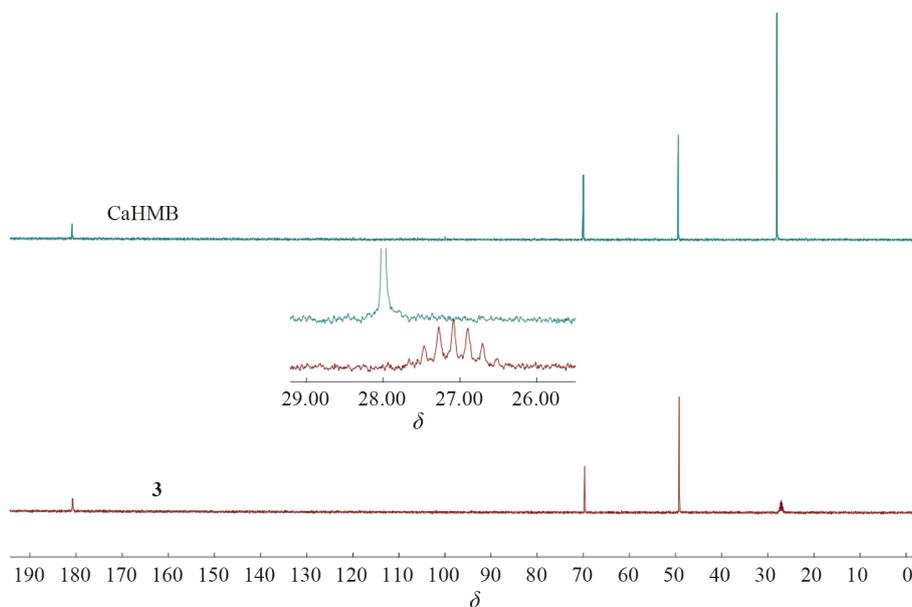


图3 CaHMB和化合物3的 $^{13}\text{C}$  NMR谱图  
Figure 3  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of CaHMB and compound 3

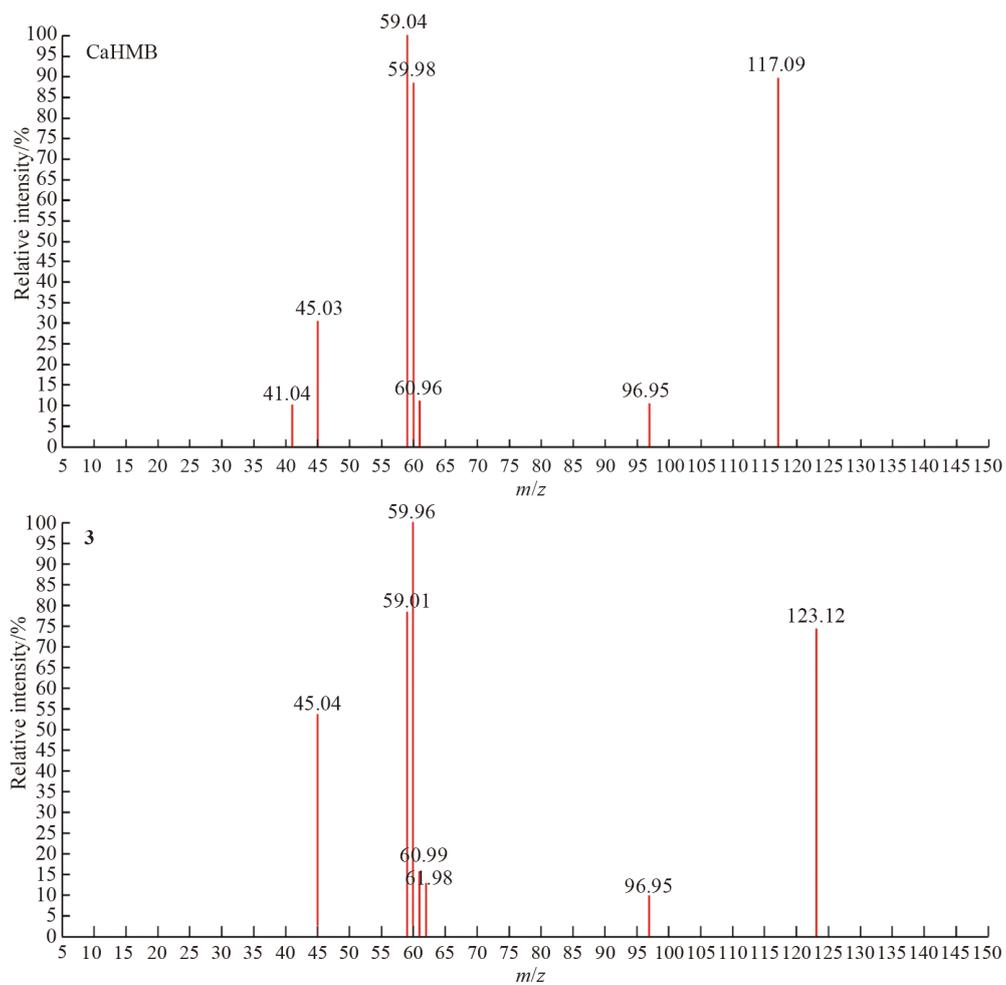


图4 CaHMB和化合物3的MS(ESI)谱图  
Figure 4 MS(ESI) spectra of CaHMB and compound 3

品用流动相溶解,进样量为 10  $\mu$ L,检测器为 DAD (210 nm),柱温为 35  $^{\circ}$ C,流速为 1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$ ,面积归一化法得到化合物 **3** 的 HPLC 纯度为 98.68%。

#### 2.4 化合物 **3** 的氘同位素丰度分析

化合物 **3** 的氘同位素丰度采用“简易质量簇”法进行测定。首先在 LC-MS/MS 上通过 SCAN 模式测得如图 4 所示的全扫谱图,通过子离子扫描确定化合物 **3** 的定量离子对为 123 $\rightarrow$ 59,然后在 MRM 模式下测得定量离子对 123 $\rightarrow$ 59, 122 $\rightarrow$ 59, 121 $\rightarrow$ 59, 120 $\rightarrow$ 59, 119 $\rightarrow$ 59, 118 $\rightarrow$ 59, 117 $\rightarrow$ 59 各自的峰面积 (A, Di),并将其分别近似等于 CaHMB-D6, CaHMB-D5, CaHMB-D4, CaHMB-D3, CaHMB-D2, CaHMB-D1, CaHMB-D0 的峰面积,基于“质谱峰强度与分子数成正比例关系”这一检测基础,归一化得到 D6~D0 各自的同位素丰度百分比  $Ri(\%)$ ,数据如表 2 所示。

表 2 化合物 **3** 的氘同位素丰度

Table 2 Deuterium isotopic enrichment of compound **3**

Di	平行样 1		平行样 2	
	A(Di)	Ri/%	A(Di)	Ri/%
D0	0	0.00	0	0.00
D1	0	0.00	0	0.00
D2	0	0.00	0	0.00
D3	0	0.00	0	0.00
D4	0	0.00	0	0.00
D5	163286	0.84	169732	0.88
D6	19298819	99.16	19103824	99.12
化合物 <b>3</b>			99.86	
氘同位素丰度/% D				

通过公式计算得到化合物 **3** 的氘同位素丰度为 99.86% D,和原料丙酮-D6 的氘同位素丰度 (99.90% D)相比,合成过程没有出现同位素丰度明显稀释的现象。

### 3 结论

本文报道了一种新型同位素内标 $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基丁酸钙-D6(**3**)及合成方法,以丙酮-D6 为起始原料和同位素来源,首先和乙酸乙酯发生 Aldol 反应得到化合物 **1**,然后通过酯水解反应得到化合物 **2**,最后和氧化钙成盐制成化合物 **3**。通过优化关键步骤 Aldol 反应的条件,能够以 80% 的总产率得

到 CaHMB-D6。该合成方法同位素原料价廉易得,合成过程简单,每步中间体均无需纯化即可直接用于下一步,最终产品产率高,且化学纯度和氘同位素丰度均在 98% 以上。整个合成路线未出现同位素丰度明显稀释现象,满足同位素内标的使用要求,可以作为同位素内标,帮助检测行业开发新的同位素稀释质谱法检测食品中 CaHMB 的含量,以及制定新的 CaHMB 检测标准。

#### 参考文献

- [1] NISSEN S, FULLER J J, SELL J, *et al.* The effect of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate on growth, mortality, and carcass qualities of broiler chickens[J]. Poultry Sci, 1994, **73**(1): 137-155.
- [2] PRADO C M, ORSSO C E, PEREIRA S L, *et al.* Effects of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate(HMB) supplementation on muscle mass, function, and other outcomes in patients with cancer: A systematic review[J]. J Cachexia Sarcopeni, 2022, **13**(3): 1623-1641.
- [3] LIN Z B, ZHAO Y P, CHEN Q W. Effects of oral administration of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate on lean body mass in older adults: A systematic review and meta-analysis[J]. Eur Geriatr Med, 2021, **12**(2): 239-251.
- [4] 中国食品科学技术学会. 关于 $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基丁酸钙(CaHMB)应用的科学共识[J]. 中国食品学报, 2024, **24**(6): 486-497.  
(Chinese institute of food science and technology. Scientific consensus on application of calcium  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate(CaHMB)[J]. JCI Food Sci Technol, 2024, **24**(6): 486-497.)
- [5] PENG L N, CHENG Y C, YU P C, *et al.* Oral nutritional supplement with  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate(HMB) improves nutrition, physical performance and ameliorates intramuscular adiposity in pre-frail older adults: A randomized controlled trial [J]. J Nutr Health Aging, 2021, **25**(6): 767-773.
- [6] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准运动营养食品通则: GB 24154-2015[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.  
(National health and family planning commission. National food safety standard general rules for sports nutrition food: GB 24154-2015[S]. Beijing: China Standard Press, 2015.)
- [7] 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 国家市场监

- 督管理总局. 食品安全国家标准特殊医学用途配方食品通则(征求意见稿): GB 29922-2024[S]. 北京: 中国标准出版社, 2024.
- (National health commission, state administration for market regulation. National food safety standard general rules for special medical formula food (exposure draft): GB 29922-2024[S]. Beijing: China Standard Press, 2024.)
- [ 8 ] 张小卫.  $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基丁酸钙的合成工艺研究[D]. 淮安: 淮阴工学院, 2021.
- (ZHANG X W. Study on the synthesis process of beta-hydroxyl-beta-methylbutyrate acid[D]. Huaiyan: Huaiyin Institute of Technology, 2021.)
- [ 9 ] 王明明, 朱晓蕾, 李青, 等. GC-MS/MS法测定保健食品中 $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基丁酸及其钙盐的含量[J]. 食品安全导刊, 2023,(17): 106-109.
- (WANG M M, ZHU X L, LI Q, *et al.* Determination of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyric acid and its calcium salt in health drinks by GC-MS/MS[J]. China Food Safety Magazine, 2023, (17): 106-109.)
- [ 10 ] 杨涛, 滕丕合, 米运宏, 等. 特殊医学用途全营养配方食品中 $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基丁酸钙的含量测定[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(5): 258-264.
- (YANG T, TENG P H, MI Y H, *et al.* Determination of calcium  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate in whole nutritional formula foods for special medical purposes[J]. J Food Saf Qual, 2023, 14(5): 258-264.)
- [ 11 ] 朱桂芳, 喻琼, 卢鑫, 等. 运动营养食品中 $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基丁酸钙的含量测定[J]. 食品科技, 2023, 48(10): 248-253.
- (ZHU G F, YU Q, LU X, *et al.* Determination of calcium  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate content in sports nutrition food[J]. Food Sci Technol, 2023, 48(10): 248-253.)
- [ 12 ] 刘春霞, 段国霞, 刘丽君, 等. 液相色谱法测定乳粉中 $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基丁酸钙的含量[J]. 饮料工业, 2024, 27(4): 34-38.
- (LIU C X, DUAN G X, LIU L J, *et al.* Determination of the content of calcium  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate in milk powder was determined by liquid chromatography[J]. Beverage Ind, 2024, 27(4): 34-38.)
- [ 13 ] DESHPANDE P, JIE Z, SUBBARAYAN R, *et al.* Development and validation of LC-MS/MS method for the estimation of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate in rat plasma and its application to pharmacokinetic studies[J]. Biomed Chromatogr, 2013, 27(2): 142-147.
- [ 14 ] 黄雨晴, 赵勇, 林毅侃. 液相色谱-串联质谱测定乳及乳制品中 $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基丁酸钙含量研究[J]. 中国食物与营养, 2024, 30(6): 51-55.
- (HUANG Y Q, ZHAO Y, LIN Y K. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of milk and dairy products  $\beta$ -hydroxyl group- $\beta$ -calcium methylbutyrate[J]. Food Nutr China, 2024, 30(6): 51-55.)
- [ 15 ] 杜晓宁, 张鹏帅, 雷雯, 等. 稳定同位素技术在我国食品安全检测领域的应用进展[J]. 同位素, 2019, 32(3): 231-243.
- (DU X N, ZHANG P S, LEI W, *et al.* Application of stable isotope technique in food safety field[J]. Journal of Isotopes, 2019, 32(3): 231-243.)
- [ 16 ] 黄雨晴, 庞贝妮, 林毅侃.  $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基丁酸及其钙盐在食品中的应用和检测研究进展[J]. 食品工业, 2024, 45(4): 217-220.
- (HUANG Y Q, PANG B N, LIN Y K. Reserarch progress on the application and detection of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyric acid and its calcium salt in food[J]. Food Ind, 2024, 45(4): 217-220.)
- [ 17 ] XI N, LI M X, PENG J, *et al.* Substituted heteroaryl compounds and methods of use: EP 3710006A4[P]. 2021.
- [ 18 ] 程玉桥, 杨光, 张贤松, 等.  $\alpha$ ,  $\beta$ -不饱和羰基化合物的合成研究进展[J]. 合成化学, 2017, 25(10): 871-880.
- (CHENG Y Q, YANG G, ZHANG X S, *et al.* Research progress on the synthesis of  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated carbonyl compounds[J]. Chin J Synth Chem, 2017, 25(10): 871-880.)
- [ 19 ] 杨学灵, 奈世杰, 魏嘉良, 等.  $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基丁酸钙含量测定及掺假判别[J]. 广州化学, 2018, 43(2): 30-34.
- (YANG X L, NAI S J, WEI J L, *et al.* Determination of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate calcium and adulteration identification[J]. Guangzhou Chem, 2018, 43(2): 30-34.)